

ビフェナゼート試験法(畜産物)

1. 分析対象化合物

ビフェナゼート

イソプロピル=2-(4-メトキシビフェニル-3-イル)ジアゼニルホルマート(以下「ビフェナゼート酸化体」という。)

4-ヒドロキシビフェニル(以下「HBP」という。)

4-スルファトビフェニル(以下「HBP硫酸抱合体」という。)

2. 装置

液体クロマトグラフ・質量分析計(LC/MS)

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

L(+)-アスコルビン酸(特級)

1,5-ジフェニルカルボノヒドラジド(以下「DPH」という。)(特級)

ビフェナゼート標準品 本品はビフェナゼート99%以上を含み、融点は120～121℃である。

HBP標準品 本品はHBP99%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及びその他の食用部分の場合は、細切均一化した後、その20.0 gを量り採る。

乳の場合は、20.0 gを量り採る。

これに0.25%酢酸含有アセトニトリル・水混液(7:3)100 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離を行う。上澄液をガラス繊維ろ紙で吸引ろ過後、遠心管内の残留物に0.25%酢酸含有アセトニトリル・水混液(7:3)50 mLを加えホモジナイズした後、上澄液を上記と同様にろ過する。得られたろ液を200 mLのメスフラスコに合わせ、0.25%酢酸含有アセトニトリル・水混液(7:3)を加えて200 mLに定容する。

2) 精製

a ビフェナゼート及びビフェナゼート酸化体試験溶液

① オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(500 mg)にアセトニトリル及び水各10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1)で得られた抽出溶液の20 mL(試料2 g相当)に水40 mLを加えたものを注入した後、容器をアセトニトリル・水混液(3:7)10 mLで洗い、洗液をカラムに注入し、流出液は捨てる。次いで、2%アスコルビン酸溶液・アセトニトリル混液(2:3)20 mLを注入し、溶出液を50 mLのナス型フラスコにとる。

② 還元処理

①の溶出液を50℃で30分間密栓加温する。放冷後、0.1%DPH含有アセトニトリル溶液1 mLを加える。

③ 活性炭カラムクロマトグラフィー

活性炭ミニカラム(500 mg)に0.01%DPH含有アセトニトリル溶液及び水各10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに②で得られた溶液を注入した後、容器を0.01%DPH含有アセトニトリル溶液・水混液(3:2)5 mLで洗い、洗液を先のカラムに注入し、流出液は捨てる。次いで、0.01%DPH含有アセトニトリル溶液25 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に0.05%DPH含有酢酸エチル溶液2 mLを加え、残留物を完全に溶かした後、*n*-ヘキサン8 mLを加える。

④ アミノプロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム(360 mg)に0.05%DPH含有酢酸エチル溶液・*n*-ヘキサン混液(1:4)10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに③で得られた溶液を注入した後、容器を0.05%DPH含有酢酸エチル溶液・*n*-ヘキサン混液(1:4)5 mLで洗い、洗液を先のカラムに注入する操作を2回繰り返す。全溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を0.02%アスコルビン酸溶液・アセトニトリル混液(2:3)に溶解し、正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

b HBP及びHBP硫酸抱合体試験溶液(脂肪以外)

① HBPへの変換

1)で得られた抽出溶液の20 mL(試料2 g相当)を100 mLのナス型フラスコに取り、塩酸2 mLを加えた後、50℃で2時間密栓加温する。

② オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー及びジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体カラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(500 mg)、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム(500 mg)及びジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム(200 mg)にそれぞれアセトニトリル及び水各10 mLを注入し、流出液は捨てる。

①で得られた溶液に水40 mLを加えたものをオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに注入した後、容器をアセトニトリル・水混液(1:3)10 mLで洗い、洗液をカラムに注入し、流出液は捨てる。次いで、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを接続し、アセトニトリル・水混液(1:1)10 mLを注入し、流出液は捨てる。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムを除去した後、アセトニトリル25 mLをジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムに注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル・水混液(1:1)に溶解し、正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ビフェナゼート標準品の0.004~0.08 mg/L 0.02%アスコルビン酸溶液・アセトニトリル混液(2:3)溶液及びHBPの0.002~0.04 mg/Lアセトニトリル・水混液(1:1)溶液を数点調製し、それぞれ10 µLをLC/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液10 µLをLC/MSに注入し、5の検量線でビフェナゼート及びHBPの含量を求める。次式により、HBPを含むビフェナゼートの含量を求める。

ビフェナゼート(HBPを含む。)の含量(ppm) = $A + B \times 1.76$

A: ビフェナゼートの含量(ppm)

B: HBPの含量(ppm)

7. 測定条件

検出器: LC/MS

カラム: オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径3 µm)、内径2 mm、長さ150 mm

カラム温度: 40℃

移動相: ビフェナゼート アセトニトリル・0.1%酢酸溶液混液(1:1)から(9:1)までの濃度勾配を5分間で行い、(9:1)で10分間保持する。

HBP アセトニトリル・0.1%酢酸溶液混液(4:6)から(9:1)までの濃度勾配を5分間で行い、(9:1)で10分間保持する。

イオン化モード: ESI

主なイオン(m/z): ビフェナゼート 正イオンモード 301.6
HB P 負イオンモード 169.0

注入量: 10 μ L

保持時間: ビフェナゼート 約7.6 分、HB P 約7.7 分

8. 定量限界

ビフェナゼート 0.008 mg/kg、HB P 0.004 mg/kg

9. 留意事項

分析対象は検体の種類によって異なる。脂肪ではビフェナゼート及びビフェナゼート酸化体を、脂肪以外ではビフェナゼート、ビフェナゼート酸化体、HB P及びHB P硫酸抱合体を分析対象とする。

1) 分析値

ビフェナゼート及びその代謝物であるHB Pのそれぞれについて定量を行い、HB Pについてはその含量に係数を乗じてビフェナゼートの含量に変換し、これらの和を分析値とすること。

2) 試験法の概要

脂肪以外は①、②の分析対象化合物を測定、脂肪は①の分析対象化合物のみ測定。

① ビフェナゼート及びビフェナゼート酸化体

試料から0.25%酢酸含有アセトニトリル・水混液(7:3)で抽出する。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムにより精製した後、還元処理によりビフェナゼート酸化体をビフェナゼートに一括変換し、さらに活性炭ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムにより精製した後、LC/MSで測定する方法である。

② HB P及びHB P硫酸抱合体

試料から0.25%酢酸含有アセトニトリル・水混液(7:3)で抽出する。HB P硫酸抱合体をHB Pに一括変換した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムにより精製した後、LC/MSで測定する方法である。

3) 注意点

- ① オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおける精製時にミニカラムが目詰まりする場合は、ミニカラム上部に脱脂綿を詰めると効果的である。
- ② ビフェナゼート精製に用いる2%アスコルビン酸溶液、0.02%アスコルビン酸溶液、0.1%DPH含有アセトニトリル溶液、0.01%DPH含有アセトニトリル溶液及び0.05%DPH含有酢酸エチル溶液は用時調製する。特にDPHを含有する溶液については調製後直ちに用いること。
- ③ ビフェナゼートの精製においてアミノプロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行う際、ミニカラム注入前の残留物はヘキサンに難溶である。0.05%DPH含有酢酸エチル溶液に完全に溶解した後に、ヘキサンを加える必要がある。

10. 参考文献

平成12年8月17日 環境省告示第53号「ビフェナゼート試験法」

11. 類型

C

12. その他

平成17年1月24日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡「食品に残留す

る農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法に係る分析上の留意事項について」の別添を参考にすること。